

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА АМИНОТРИПЕПТИДАЗЫ МОЗГА КОШЕК

МЕЛЕШКО В. И., ГЕНГИН М. Т., РЕВА А. Д.

Кафедра биофизики и биохимии Днепрпетровского госуниверситета

Из головного мозга кошек выделена и очищена в 643 раза растворимая аминотрипептидаза (субстрат Leu-Gly-Gly). Фермент гомогенен при разделении в 7,5%-ном ПААГ. Величина M_r равна 70—72 кД, рН оптимум—7,6. Очищенный препарат фермента не гидролизует дипептиды, не действует на энкефалины. Активность фермента не зависит от ионов двухвалентных металлов, не чувствительна к ЭДТА, п-хлормеркурибензоат подавляет активность аминотрипептидазы.

В последнее время значительно возрос интерес к протеолитическим ферментам нервной ткани. Обусловлено это прежде всего тем, что ферменты протеолиза рассматриваются как важный фактор регуляции внутриклеточного метаболизма благодаря их участию в посттранскрипционной модификации белков [1]. Некоторые пептидгидролазы мозга выступают в качестве компонентов систем, обеспечивающих функционирование пептидергических синапсов, катализируя реакции образования и распада пептидов (медиаторов, модуляторов) [2, 3].

Важная роль в обмене нейропептидов отводится ферментам с аминопептидазной специфичностью действия. Так, например, инактивация энкефалинов в мозгу осуществляется преимущественно под действием энкефалинаминопептидазы [4]. Показано, что катаболизм Arg-вазопрессина и окситоцина также связан с действием аминопептидаз [5].

В мозгу обнаружены несколько различающихся по свойствам, внутриклеточной локализации и специфичности действия аминопептидаз [6—10]. Среди них идентифицированы аминотрипептидазы—ферменты, специфически гидролизующие только трипептидные субстраты [11—13]. Были выделены и очищены аминотрипептидазы до гомогенного состояния из мозга быка [11], обезьяны [12] и крыс [13]. В то же время в нервной ткани животных обнаружены и идентифицированы трипептиды, обладающие гормональными и модуляторными свойст-

сами [13]. В гипофизе и в некоторых других тканях выявлен специфический фермент (трипептидиламинопептидаза), отщепляющий N-концевые трипептиды от бычьего гормона роста [14].

В этой связи определенный интерес представляет изучение ферментов, принимающих участие в деградации трипептидных субстратов.

Целью настоящей работы было выделение из головного мозга кошек растворимой аминопептидазы, гидролизующей Leu-Gly-Gly, и изучение её физико-химических свойств.

Материалы и методы

Фермент выделяли из больших полушарий головного мозга половозрелых кошек. Животных декапировали, быстро извлекали головной мозг и помещали в охлажденный (0—4°) раствор 0,25 М сахарозы, затем очищали его от оболочек и кровеносных сосудов, промывали от остатков крови в 0,25 М сахарозе и гомогенизировали в 0,01 М калий-фосфатном буфере pH 7,6, в соотношении 1:9 (масса/объем). Центрифугированием гомогената при 30000 g в течение 60 мин отделяли субклеточные структуры. Белки надосадочной жидкости фракционировали сериюкислым аммонием. Фракцию 0,4—0,7 насыщения, обладающую максимальной величиной U. A. фермента, растворяли в 0,1 М K⁺-фосфатном буфере, pH 7,6, диализовали против этого же буфера и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом A-50 (1,8×18 см). Колонку с гелем предварительно уравнивали калий-фосфатным буфером (0,01 М, pH 7,6) и элюировали им несвязавшиеся с ионообменником белки. Фракционирование связавшихся белков проводили в линейном градиенте K⁺-фосфатного буфера pH 7,6 (0,01—0,2 М). Фракции с аминотрипептидазной активностью объединяли, диализовали против 0,01 М фосфатного буфера pH 6,5 и наносили на колонку с гидроксилапатитом (2,5×3 см), уравниваемую этим же буфером. Промыванием колонки стартовым буфером удаляли несвязавшиеся белки, а сорбированные белки фракционировали линейным градиентом (0,01—0,2 М) фосфатного буфера, pH 6,5. Последняя стадия очистки фермента включала фракционирование на колонке (1,5××68 см) с сефадексом G-200.

Очищенный препарат исследовали на гомогенность, субстратную специфичность, влияние ингибиторов, различных реагентов и другие свойства.

Активность фермента определяли, как описано ранее [15], белок—спектрофотометрически и по методу Lowry [16]. Ферментативную активность выражали в мкмоль аминогрупп, освобожденных при гидролизе Leu-Gly-Gly за 60 мин инкубации при 37° в расчете на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистка аминотрипептидазы. При подобранных условиях фракционирования белков на ионообменнике (рис. 1, табл. 1) достигается высокая степень очистки фермента. Величина U. A. аминотрипептидазы во фракциях, полученных на этой стадии, составляет 46,6 мкмоль, что соответствует 173-кратной очистке по отношению к гомогенату. Фракции с ферментативной активностью объединяли и наносили на колонку с гидроксилапатитом. На рис. 2 представлена типичная хроматограмма белков и профиль элюции фермента при очистке на гидроксилапатите. Фракции, содержащие аминотрипептидазу, объединяли, концентрировали на ультрафильтре УАМ-150 и на-

носили на колонку с сефадексом G-200 (рис. 3). На стадии гель-фильтрации получен препарат фермента с очисткой в 643 раза. Выход аминотрипептидазы по отношению к суммарной активности в гомогенате составил 9%.

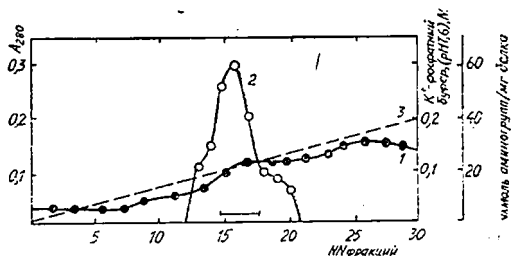


Рис. 1. Очистка аминотрипептидазы из головного мозга кошек на ионообменнике ДЭАЭ-сефадексе А-50: 1—белок, 2—активность фермента, 3—градиент буфера

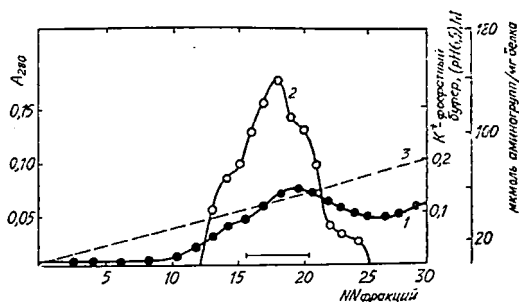


Рис. 2. Профиль элюции аминотрипептидазы при хроматографии на колонке с гидроксиплатитом: 1—белок, 2—активность фермента, 3—градиент буфера

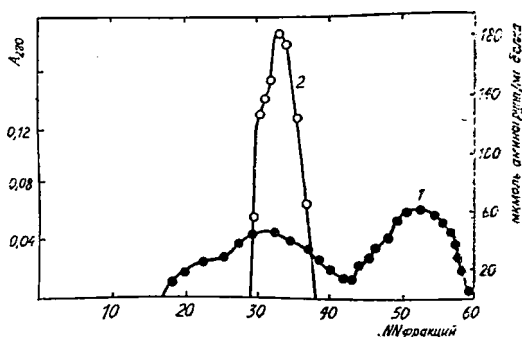


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-200 препарата аминотрипептидазы, полученного после очистки на гидроксиплатите: 1—белок, 2—активность фермента

Определение величины M_r очищенного препарата аминотрипептидазы. M_r фермента определяли двумя методами—гель-фильтрацией и диск-электрофорезом в ПААГ с ДДС-На. В первом случае колонку калибровали белками с известной величиной M_r (цитохром С—12,3 кД, овальбумин—45 кД, бычий сывороточный альбумин—68 кД,

Таблица 1

Выделение и очистка аминотрипептидазы из головного мозга кошек

Стадии очистки	Объем, мл	Содержание белка		Активность		Выход, %	Степень очистки
		общее	мг/мл	общая	удельная		
Гомогенат	180	1440	8	388,8	0,27	100	1
Супернатант	140	262,5	1,9	238,1	1,08	72,8	4
Фракция 0,4—0,7 насыщения ДЭАЭ-сефалекс	40	121,6	3,04	211,5	1,74	54,4	6,4
А-50	30	3,43	0,114	159,6	46,60	41,1	173
Гидроксилапатит	15	0,93	0,062	107,22	115,30	27,6	427
Сефалекс G-200	5	0,20	0,040	34,83	174,15	9,0	643

щелочная фосфатаза—80 кД и гексокиназа—100 кД). Результаты опытов представлены на рис. 4. Величина M_r очищенного препарата аминотрипептидазы из мозга кошек по данным гель-фильтрации составляет 70 кД. Методом диск-электрофореза с ДДС-На была получена единственная белковая зона со значением относительной подвижности, соответствующей M_r 72 кД (рис. 4). Данные диск-электрофореза

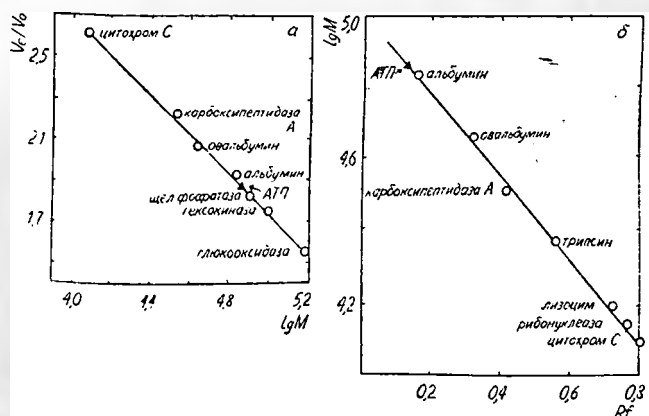


Рис. 4. Определение величины M_r аминотрипептидазы методами гель-фильтрации (а) и диск-электрофореза (б)

итического анализа свидетельствуют о гомогенности очищенного препарата аминотрипептидазы и указывают на то, что аминотрипептидаза является простым белком, состоящим из одной полипептидной цепи.

Выделенный фермент из мозга кошек по величине M_r близок к одной из форм аминоксипептидаз, выделенных из мозга быка [11]. Авторы упомянутой работы изолировали три формы фермента, две из которых имели M_r , равные 61,5 и 85,7 кД. Очищенная аминоксипептидаза из мозга обезьяны, по данным гель-фильтрации, имела M_r 65 кД, а по данным диск-электрофореза—70 кД [12]. Возможно, что существуют различия в размерах молекул аминоксипептидазы мозга в зависимости от вида животных. Однозначное заключение, по-видимому, будет преждевременным из-за недостатка сведений и, кроме того, не исключено, что разные значения величины M_r фермента обусловлены методическими погрешностями.

Влияние различных концентраций субстрата (Leu-Gly-Gly) на активность аминоксипептидазы. На рис. 5, а представлены результаты опытов по исследованию зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. График зависимости скорости реак-

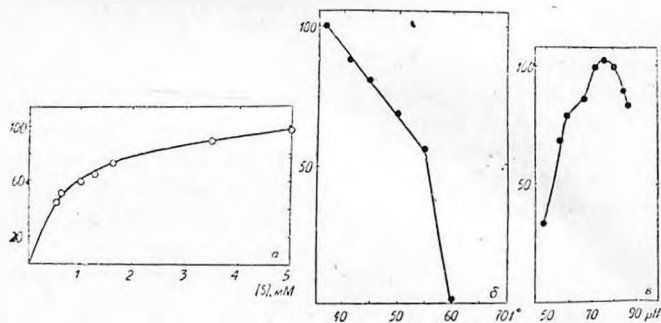


Рис. 5. Зависимость активности аминоксипептидазы мозга от насыщения субстратом (а), температуры (б) и рН инкубационной среды (в)

ции от концентрации субстрата представляет собой равнобочную гиперболу. Величина K_m , рассчитанная по Корнш-Боудену [17], равна 0,69 мМ. Значение K_m , полученное в наших опытах, сопоставимо со значениями K_m для аминоксипептидаз из мозга и других органов животных [8, 11—13, 18].

Влияние температуры на активность фермента. Аликвоты очищенного белка аминоксипептидазы предварительно нагревали в течение 15 мин при различных значениях температуры в интервале от 37 до 70°, затем охлаждали на ледяной бане, добавляли субстрат и инкубировали, как обычно при определении активности фермента. Результаты этой серии опытов представлены на рис. 5, б. Остаточную активность фермента после его нагревания при 37° принимали за 100%. Установлено, что аминоксипептидаза постепенно инактивируется при нагревании от 37 до 55°. Предварительное нагрева-

ние при температуре 55° приводит к полной инактивации аминотрипептидазы. При аналогичных условиях также наступает полная инактивация аминотрипептидазы, выделенной из мозга обезьяны [12].

Влияние pH среды на активность аминотрипептидазы. На рис. 5, в приведены данные опытов по определению активности фермента при различных значениях pH инкубационной среды. Видно, что высокоочищенная форма аминотрипептидазы мозга кошек имеет четко выраженный оптимум действия при pH 7,6. Высокоспецифичная аминотрипептидаза цитозоля мозга крыс проявляет максимальную активность к трипептидному субстрату при pH 7,8 [13]. Аминотрипептидаза из мозга обезьяны с наибольшей скоростью гидролизует Leu-Gly-Gly при pH 7,5 [12]. Таким образом, выделенная из мозга кошек аминотрипептидаза имеет практически такое же значение pH оптимума действия, как и соответствующие ферменты из мозга крыс [13] и обезьяны [12].

Влияние ионов металлов и других реагентов на активность аминотрипептидазы. Исследование влияния ионов металлов и других реагентов на активность ферментов дает возможность получить информацию об активных функциональных группах каталитического центра и в некоторой степени о механизме катализа. Было изучено влияние ионов двухвалентных металлов и ряда ингибиторов пептидгидролаз. Результаты проведенных опытов суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Влияние ионов металлов и других реагентов на активность аминотрипептидазы головного мозга кошек

Реагент	Концентрация, ммоль	Скорость гидролиза, %
Контроль	—	100
Mn ²⁺	1	124
Mg ²⁺	1	110
Co ²⁺	1	106
Ca ²⁺	1	93
Zn ²⁺	1	0
ЭДТА	1	93
ЭДТА	5	86
p-ХМБ	1	0
Иодацетат	1	14
β-меркаптоэтанол	1	110
Пурамицин	1	93
Бацитрацин	1	100

По-видимому, исследуемый фермент для проявления каталитической активности не требует ионов металлов, поскольку их присутствие в инкубационной среде не сказывается на его активности. Активирование аминотрипептидазы Mg²⁺ не столь существенно, в то время как металлзависимые аминопептидазы активируются металлами в несколько раз [19]. Полученные данные по влиянию ЭДТА также свидетельствуют в пользу предположения о независимости ферментативного катализа от ионов металлов. SH-реагенты полностью

подавляют активность аминотрипептидазы, что указывает на существенную роль сульфгидрильных групп аминокислотных остатков фермента в механизме катализа. Модификация S-S-связей путем добавления в инкубационную среду β -меркаптоэтанола не оказывает заметного влияния на активность фермента, то есть роль этих связей в молекуле аминопептидазы не существенна для катализа. Микробные антибиотики пуромидин и бацитрацин не оказывают значительного влияния на активность аминотрипептидазы. Пуромидин является специфическим ингибитором ариламидаз—ферментов, гидролизующих β -нафтиламидные и п-нитроанилидные производные аминокислот [20]. Бацитрацин менее специфичен и подавляет активность аминопептидаз, различающихся по свойствам и специфичности действия. Отсутствие ингибирующего эффекта пуромидина и бацитрацина свидетельствует о том, что исследуемый фермент не является ариламидазой, а относится к особой группе аминопептидаз, действующих на трипептидные субстраты.

Исследование субстратной специфичности аминопептидазы мозга: Субстратную специфичность изучали, используя синтетические субстраты. Исследовали только те из них, которые содержат гидрофобные аминокислоты с N-конца, так как известно, что другие ди- и трипептидные субстраты практически не гидролизуются изученными аминотрипептидазами из нервной ткани [11—13]. Конечная концентрация того или иного субстрата в реакционной смеси составляла $5 \cdot 10^{-3}$ М. Скорость гидролиза Leu-Gly-Gly принимали за 100%. Результаты опытов обобщены в табл. 3.

Таблица 3

Субстратная специфичность аминопептидазы мозга кошек

Субстрат	Активность, %	Субстрат	Активность, %
Leu-Gly-Gly	100	Gly-Gly	0
Ala-Gly-Gly	70	Gly-Gly + Co^{2+} (1 мМ)	0
Gly-Gly-Gly	13	бенз-Ala	0
Ala-Ala	0	бенз-Met	0
Ala-Gly	0	2,4-ДНФ-Leu	0
Ala-Trp	0	2,4-ДНФ-Gly	0
Ala-Asn	0	Ala-p-нитроанилид	0
Gly-Phe	0	Leu- β -нафтиламид	0
Gly-Ala	0	Leu-энкефалин	0
Gly-Val	0	Met-энкефалин	0
Val-Gly	0		

Как установлено, аминопептидаза мозга кошек гидролизует лишь трипептиды, однако и они гидролизуются с различной скоростью. Лимитирующим фактором в скорости гидролиза трипептидов является строение N-концевой аминокислоты. Учитывая предполагаемый механизм ферментативного катализа, где, как показано выше, гидролиз субстрата осуществляется без участия ионов металлов, следует отметить, что ферменты с подобным механизмом действия имеют «карман» активного центра, строго соответствующий по конформа-

ции специфическому субстрату [21]. Остаток N-концевого аланина и тем более глицина значительно меньше лейцинового. Этим, по-видимому, и можно объяснить различие в скоростях гидролиза близких по строению трипептидов, отличающихся лишь по N-концевой аминокислоте. Фермент не гидролизует дипептиды, не проявляет карбокси-пептидазной, ариламидазной активности и не действует на энкефалины.

Суммируя данные по изучению свойств и специфичности действия фермента, можно сказать, что аминотрипептидаза из мозга кошек является типичной аминотрипептидазой. Исследуемый фермент по физико-химическим свойствам и специфичности действия близок к ферменту, выделенному из мозга обезьяны [12] и цитозоля мозга крыс [13].

Физиологическая роль аминотрипептидазы в мозгу остается неясной. Возможно, что этот фермент принимает участие в деградации нейропептидов трипептидной природы [22]. Не исключена и роль аминотрипептидазы в разрушении «сигнальных» пептидов, которые в большинстве случаев состоят из 20—30 аминокислот, содержат большое число нейтральных гидрофобных аминокислот и имеют сходное строение [23]. Учитывая строгую субстратную специфичность фермента к Leu-Gly-Gly, можно предположить, что изучаемая аминотрипептидаза ответственна и за регулирование пула лейцина, являющегося типичной «кетогенной» аминокислотой [24]. Преимущественная локализация фермента в цитозоле, а также относительно высокая активность этого фермента по сравнению с другими пептидгидролазами мозга [25] дают основание полагать, что аминотрипептидаза принадлежит важная роль в катаболизме внутриклеточных белков на заключительных стадиях.

PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF AMINOTRIPEPTIDASE FROM CAT BRAIN

MELESHKO V. I., GENGIN M. T., REVA A. D.

Chair of Biophysics and Biochemistry, Dnepropetrovsk State University

Soluble aminotripeptidase has been purified 643-fold from cat brain. The enzyme appeared to be homogeneous on disc PAAg electrophoresis. Its molecular weight is about 70—72 kDa. The pH optimum is 7.6 (Leu-Gly-Gly as substrate). The purified enzyme did not hydrolyze dipeptides and enkephalins. Enzyme activity is not affected by divalent metal ions and EDTA. The aminotripeptidase activity was completely inhibited by p-CMB (10^{-3} M).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schimke R. T., Bradrey M. O.*—In: *Proteases and Biological Control* (Reich E., Rifkin D. B., Shaw E., eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 2, p. 515—530, 1975.
2. *Ерошкин М. Ю.* Успехи соврем. биол., т. 95, № 1, с. 65—83, 1983.
3. *Edwardson J. A. J.* *Inher. Metab. Dis.*, v. 5, № 1, p. 82—88, 1982.
4. *Meek J. L., Yang H.—Y. T., Costa E.* *Neuropharmacology*, v. 16, № 1, p. 151—156, 1977.
5. *Burbach J. P. H., Lebouille J. L. M.* *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 4, p. 1487—1494, 1983.
6. *Ellis S.* *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 12, № 2, p. 452—456, 1963.
7. *Brecher A. S., Sobel R. E.* *Biochem. J.*, v. 105, № 2, p. 641—646, 1967.
8. *Marks N., Lajtha A.* *Methods in Enzymology*, v. 19, № 2, p. 531—543, 1970.
9. *Serra S., Grynbaum A., Lajtha A., Marks N.* *Brain Res.*, v. 44, № 2, p. 579—592, 1972.
10. *Hazato T., Inagaki-Shimamura M., Katajama T., Yamamoto T.* *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 105, № 2, p. 470—475, 1982.
11. *Sobel R. E., Brecher A. S.* *Can. J. Biochem.*, v. 49, № 6, p. 677—685, 1971.
12. *Hayashi M., Oshima K.* *J. Biochem.*, v. 87, № 5, p. 1403—1411, 1980.
13. *Sachs L., Marks N.* *Biochim. et biophys. acta*, v. 796, № 2, p. 229—238, 1982.
14. *Doebber T. W., Divor A. R., Ellis S.* *Endocrinology*, v. 103, № 5, p. 1794—1804, 1978.
15. *Мелешко В. И., Генгин М. Т., Рева А. Д.* Докл. АН УССР, Б, № 11, с. 73—75, 1983.
16. *Lewry O. N., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. H.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
17. *Корниш-Бовден Э.* Основы ферментативной кинетики (под ред. Б. И. Курганова). М., Мир, 1979.
18. *Douteng C., Maroux S.* *Biochem. J.*, v. 177, № 3, p. 801—808, 1979.
19. *Колодзейская М. В., Пилявская М. В.* Пептидазы, Киев, Наукова думка, 1981.
20. *Hersh L. B.* *J. Neurochem.*, v. 36, № 4, p. 1594—1596, 1981.
21. *Фёршт Э.* Структура и механизм действия ферментов (под ред. Б. И. Курганова). М., Мир, 1980.
22. *Рева А. Д., Мелешко В. И., Генгин М. Т., Жерносеков Д. Д.*—В кн.: Тезисы девятой всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, Ереван, 1983, с. 81—82, 1983.
23. *Локушина Л. А.* Молекуляр. биология, т. 13, № 6, с. 1205—1229, 1979.
24. *Millward D. J., Bates P. C., Benoist B. de, Brown J. S., Cox M., Halliday D., Oderda B., Rennie M. J.* „Colloq. INRA“, № 16/1, p. 68—96, 1983.
25. *Marks N., Galojan A., Grynbaum A., Lajtha A.* *J. Neurochem.*, v. 22, № 5, p. 735—739, 1974.

Поступила 12. VI 1985